

## Method and apparatus for cell culture.

Publication number: EP0224800 (A2)

Publication date: 1987-06-10

Inventor(s): KEARNS MICHAEL DR; COMER MICHAEL JAMES DR RER NAT; STEEGMANS ULRICH; JUNGFER HERBERT DR MED

Applicant(s): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE]

Classification:

- International: C12M3/02; C12M3/06; C12N5/02; C12M3/02; C12M3/06; C12N5/02; (IPC1-7): C12M3/00

- European: C12M3/06

Application number: EP19860116036 19861120

Priority number(s): DE19853541738 19851126

### Also published as:

EP0224800 (A3)

EP0224800 (B1)

JP62130683 (A)

DE3541738 (A1)

ES2038965 (T3)

### Cited documents:

FR2238759 (A1)

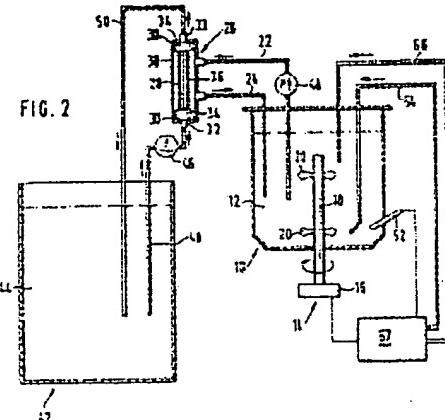
EP0112155 (A2)

EP0039055 (A1)

JP60207581 (A)

### Abstract of EP 0224800 (A2)

The method for cultivating cells entails a cell culture being maintained in substantially homogeneous suspension in a reactor under controlled ambient conditions in a culture medium using a stirring device, nutrients for the cells being fed in, and waste products of the cells being removed. A particularly high cell density and product yield is achieved by the combination of the following measures: a nutrient medium separate from the culture medium is used and flows in a flow path which is separated from the culture medium by a semipermeable membrane, the membrane being permeable for the nutrients and the waste products of the cells but impermeable for the high molecular weight constituents of the culture medium.; The culture medium with the cells is passed by one side of the membrane, the nutrient medium containing the nutrients is passed by the other side of the membrane so that nutrients pass out of the nutrient medium through the membrane into the culture medium, and waste products pass out of the culture medium into the nutrient medium.





Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer: 0 224 800  
A2

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: 86116036.4

⑭ Int. Cl.: C12M 3/00

⑮ Anmeldetag: 20.11.86

⑯ Priorität: 26.11.85 DE 3541738

⑰ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
10.06.87 Patentblatt 87/24

⑱ Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

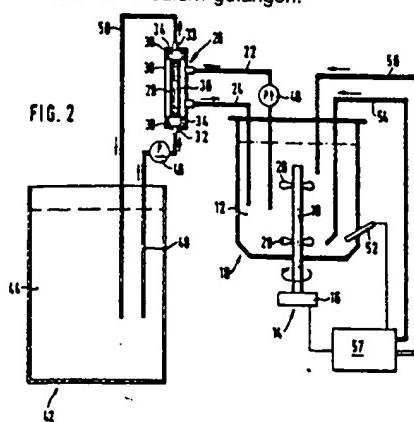
⑲ Anmelder: Boehringer Mannheim GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
D-6800 Mannheim 31(DE)

⑳ Erfinder: Kearns, Michael, Dr.  
Banhofstrasse 1  
D-5124 Seeshaupt(DE)  
Erfinder: Comer, Michael James, Dr. rer. nat.  
Eichenstrasse 4  
D-8139 Bernried(DE)  
Erfinder: Steegmans, Ulrich  
Hauptstrasse 95  
D-8132 Tutzing(DE)  
Erfinder: Jungfer, Herbert, Dr. med.  
Berlingerweg 10  
D-8132 Tutzing(DE)

### ④ Verfahren und Vorrichtung zum Kultivieren von Zellen.

⑤ Verfahren zum Kultivieren von Zellen, bei dem eine Zellkultur in einem Reaktor unter kontrollierten Umweltbedingungen in einem Kulturmedium mittels einer Röhreinrichtung in weitgehend homogener Suspension gehalten wird, Nährstoffe für die Zellen zugeführt und Abfallprodukte der Zellen abgeführt werden. Eine besonders hohe Zelldichte und Produktausbeute wird durch die Kombination folgender Maßnahmen erreicht: Es wird ein von dem Kulturmedium getrenntes Nährmedium verwendet, das in einem von dem Kulturmedium durch eine semipermeable Membran getrennten Strömungsweg strömt, wobei die Membran so ausgelegt ist, daß sie für die Nährstoffe und die Abfallprodukte der Zellen durchlässig ist, für die höhermolekularen Bestandteile des Kulturmediums aber undurchlässig ist, an der einen Seite der Membran wird das Kulturmedium mit den Zellen vorbeigeführt, an der anderen Seite der Membran wird das die Nährstoffe enthaltende Nährmedium vorbeigeführt, so daß Nährstoffe aus dem Nährmedium durch die Membran in das Kulturmedium gelangen und Abfallstoffe aus dem Kulturmedium in das Nährmedium gelangen.

EP 0 224 800 A2



### Verfahren und Vorrichtung zum Kultivieren von Zellen

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Kultivieren von Zellen im Rahmen der Biotechnologie. Insbesondere richtet sie sich auf die Vermehrung von Säugetierzellen in vitro.

Im Rahmen der Biotechnologie werden biologische Produkte, beispielsweise monoklonale Antikörper, Interferone, Impfstoffe, Plasminogen-Aktivatoren uva., mit Hilfe von Zellen, insbesondere Säugetierzellen, erzeugt. Die Wirtschaftlichkeit derartiger Verfahren ist wesentlich davon abhängig, daß sich die Zellen möglichst stark vermehren und in ihrem Innern eine möglichst hohe Konzentration der gewünschten Substanz erreicht wird. Um diese Ziele zu erreichen, werden an die Verfahren und Vorrichtungen zur großtechnischen Kultivierung von Zellen besondere Anforderungen gestellt. So muß insbesondere für eine ausreichende Nährstoffzufuhr sowie Zufuhr von Gasen, insbesondere Sauerstoff, Sorge getragen werden.

Abfallprodukte, d.h. Stoffwechselprodukte der Zellen, die nicht in der Zellkultur gebraucht werden und deren Wachstum vielfach hemmen, müssen entfernt werden. Auch alle übrigen Umweltbedingungen, wie beispielsweise Temperatur und pH-Wert, sollen möglichst optimal sein.

In dem Artikel "Mammalian cell culture: engineering principles and scale-up" von M.W. Glacken et al in der Zeitschrift "Trends in Biotechnology", 1983, p. 102 -108 sind diese Probleme und eine Vielzahl von Konstruktionsprinzipien für entsprechende Geräte zur Kultivierung von Zellen dargestellt.

Wie diesem Artikel zu entnehmen ist, muß man zwischen Suspensionszellen und trägerabhängigen Zellen unterscheiden. Während die Suspensionszellen frei in dem Zellkulturmedium schwaben und wachsen können, bedürfen die trägerabhängigen Zellen, die auch als adhärente Zelle bezeichnet werden, eines festen Trägers, um überleben und wachsen zu können.

In dem Artikel wird neben den oben erwähnten Problemen besonderes die Problematik des "upscaling" herausgestellt. Es hat sich nämlich gezeigt, daß Methoden, die im Labormaßstab ausreichend funktionieren, für die Massenproduktion ungeeignet sind.

Traditionell werden Säugetierzellen ebenso wie Bakterienzellen primär als Suspensionskulturen in Bioreaktoren kultiviert, die auch als Fermenter bezeichnet werden. In einem derartigen Gefäß können die Umweltbedingungen genau kontrolliert werden. Eine Röhreinrichtung bewegt das Kulturmedium im Innern des Reaktors und sorgt somit für eine homogene Verteilung der Zellen. Eine entsprechende Kulturtechnik wird für adhärente Zellen dadurch möglich, daß sich diese auf kleinen Trägerkügelchen befinden, die als "Micro Carrier" bezeichnet werden. Diese schweben in dem Kulturmedium.

Die Zufuhr von Nährstoffen zu den Zellen und die Abfuhr von Abfallstoffen geschieht bei Suspensionskulturen in Bioreaktoren nach einem der folgenden drei Verfahren:

Im Batchbetrieb wird der Reaktor diskontinuierlich betrieben. Bei Beginn eines Ansatzes enthält das Kulturmedium üblicherweise ein Serum, beispielsweise fötales Kälberserum (FKS) und die notwendigen Nährstoffe, beispielsweise Glucose, Vitamine, Aminosäuren und Mineralien. Im Betrieb werden diese verbraucht, so daß das Medium immer mehr an Nährstoffen verarmt. Gleichzeitig nimmt die Konzentration von Abfallprodukten zu, was schließlich zu einer Behinderung des Zellwachstums führt. Die Folge davon ist ein Verlauf der Zelldichtheckurve, wie er in Figur 1 a dargestellt ist. Die Zelldichte erreicht einen Maximalwert von etwa 10<sup>6</sup> Zellen/ml und nimmt danach wieder ab. Deswegen wird die Kultivierung abgebrochen, wenn die maximale Zelldichte erreicht ist. Der Reaktorinhalt wird dann der Weiterverarbeitung zugeführt. Dieses Verfahren ist insoweit unbefriedigend, als sich die Umwelt der Zellen ständig ändert und deswegen während der meisten Zeit des Fermentationsvorgangs keineswegs optimal ist. Dies könnte zwar verbessert werden, indem das Kulturmedium mehrfach aufgefrischt wird, ohne dabei Zellen zu entnehmen. Dazu müßte jedoch wiederholt eine Teilmenge des Kulturmediums entfernt werden, obwohl es noch keineswegs verbraucht ist. Ein derartiges Verfahren ist äußerst aufwendig, weil die bekannten Kulturmedien schwer zu beschaffen und deswegen teuer sind.

In dieser Hinsicht besser ist das sogenannte "Fedbatch-Verfahren", bei dem während des Fermentationsvorganges nicht frisches Kulturmedium in seiner Gesamtheit, sondern nur die verbrauchten Nährstoffe kontinuierlich zugeführt werden. In der Praxis bringt dieses Verfahren jedoch keine wesentlichen Vorteile, weil die Zunahme der Abfallstoffe zu einem ähnlichen charakteristischen Verlauf der Zelldichte während des Kultivierungsvorganges führt wie beim reinen Batchverfahren.

Das dritte Verfahren ist das kontinuierliche Verfahren in einem sogenannten Chemostat oder Cytostat. Hier können die Umweltbedingungen gleichmäßig eingestellt werden, so daß die Zellen optimal wachsen können. Das Verfahren ist jedoch sehr aufwendig, weil kontinuierlich Kulturmedium zugeführt und abgeführt wird. Außerdem wird auch bei diesem Verfahren keine wesentlich höhere Zelldichte als bei den vorgenannten Verfahren erreicht, weil mit dem auslaufenden Zellkulturmedium ständig auch Zellen aus dem Reaktor abgeführt werden.

Unabhängig davon, welches der drei beschriebenen Betriebsverfahren für Suspensionskulturen gewählt wird, sind also die Ergebnisse nicht befriedigend, insbesondere weil der Verbrauch an wertvollem Zellkulturm̄edium zu hoch ist und weil eine höhere maximale Zelldichte wünschenswert ist. Dieses letztere Kriterium ist von besonderer Bedeutung, weil die vorliegenden Erfahrungen zeigen, daß die Konzentration der gewünschten Produkte in den Zellen mit zunehmender Zelldichte zunimmt. Eine Steigerung der Zelldichte führt deshalb zu einer überproportionalen Steigerung der Ausbeute an Produkt.

Um eine weitere Verbesserung zu erreichen, wurden neue Verfahren vorgeschlagen.

Die sogenannten "Systeme mit künstlichen Kapillaren" bestehen im wesentlichen aus einem Bündel von Dialyse-Hohlfasern, die im Inneren eines hohlen Zylinders angeordnet sind. Sie werden vor allen Dingen für die Kultivation adhärenter Zellen empfohlen. Dabei werden die Zellen auf der Außenseite der Hohlfasern angelagert, befinden sich als in den Zwischenräumen zwischen den Hohlfasern innerhalb des zylindrischen Gehäuses. Ein Kulturmedium strömt durch die Innenseite der Kapillaren. Luft wird durch die Gehäuseaußenseite den Zellen zugeführt. Mit einem derartigen Verfahren wird eine verhältnismäßig gleichmäßige und sparsame Zufuhr der Nährstoffe zu den Zellen erreicht. Auch die Zelldichte konnte geringfügig erhöht werden. Obwohl die Zufuhr der Nährstoffe gleichmäßig ist, zeigt sich jedoch, daß die Zellen unterschiedlich gut versorgt werden. Dies wird insbesondere darauf zurückgeführt, daß sie in mehreren Schichten auf den Kapillaren sitzen. Dadurch wird auch die Sauerstoffzufuhr beschränkt, was zu einer erhöhten Produktion an Abfallprodukten führen kann.

Derartige Hohlfaserfermenter sind in den europäischen Patentanmeldungen mit den Publikationsnummern 112 154 und 112 155 beschrieben. In der letztgenannten Druckschrift ist das System insoweit variiert, als die Zellen mittels einer Pumpe im Kreislauf durch den Kultivationsmodul gepumpt werden.

Hohlfasern, deren Wände aus einem Membranmaterial bestehen, werden auch bei dem in der japanischen Offenlegungsschrift 60-20 75 81 beschriebenen Zellkultivierungsverfahren eingesetzt. Die Hohlfasern befinden sich im Kulturmedium im Innenraum eines Fermenters. Das Innere der Hohlfasern ist über eine einzige Leitung, die sowohl der Zufuhr als auch der Abfuhr von Flüssigkeiten dient mit dem Außenraum verbunden. Mit Hilfe einer Pumpe werden durch diese Leitung Abfallstoffe der Zellen durch die Wandung der Hohlfasern hindurch abgesaugt bzw. in einem zeitlich davon getrennten Zyklus sterilisiertes Wasser, welches den Zellen nicht schadet, zugeführt. Diesem sterilisierten Wasser können gegebenenfalls auch Nährstoffe für die Zellen beigegeben sein. Im Betrieb wird abwechselnd in die Kulturflüssigkeit hineingepumpt und aus dieser abgesaugt. Dieser Zyklus wird fortlaufend wiederholt. Um die Nachteile der diskontinuierlichen Betriebsweise zu vermeiden werden bevorzugt eine geradzahlige Anzahl von Hohlfaserbündeln eingesetzt, welche alternierend betrieben werden, d. h. während durch die eine Hälfte der Hohlfaserbündel aus dem Kulturmedium abgesaugt wird, wird durch die andere Hälfte der Hohlfaserbündel Flüssigkeit zugeführt. Dieses Verfahren ist verhältnismäßig aufwendig und bringt die Gefahr mit sich, daß die Hohlfasern durch die ständige alternierende Druckbelastung von der einen und von der anderen Seite beschädigt werden.

Eine andere neuartige Technologie sieht vor, die Zellen in kugelförmige Mikrokörper aus einem semipermeablen Membranmaterial einzuschließen. Dies wird in dem zitierten Artikel als einziges neues Verfahren für die Kultivierung von Suspensionszellen bezeichnet. Es führt zu einer Erhöhung der Zelldichte in den kleinen Kugelkörpern, was wiederum eine Erhöhung der Produktausbeute nach sich zieht. Das Ernten der Zellen ist einfach, weil sich die Kugelkörperchen aufgrund der Schwerkraft absetzen, während Einzelzellen in der Regel zentrifugiert werden müssen. Diesen Vorteilen stehen sehr hohe Kosten für das Einkapseln der Zellen gegenüber. Außerdem ist die Sauerstoffzufuhr zu den Zellen beschränkt, was wiederum den Kultivationserfolg mindert.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die vorliegende Erfindung die Aufgabe, ein einfaches und kostengünstiges Verfahren und eine entsprechende Vorrichtung zur Kultivierung von Zellen zur Verfügung zu stellen, die eine erhöhte Zelldichte und infolgedessen eine erhöhte Produktausbeute ermöglichen.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüche gekennzeichnete Erfindung gelöst.

Die Erfindung geht von dem klassischen Bioreaktor aus, in dessen Innenraum sich die Zellen befinden. Sie eignet sich besonders für Suspensionszellen, ist jedoch auch auf adhärente Zellen anwendbar, insbesondere wenn diese auf Mikro-Carriern angesiedelt sind, wie dies in dem zitierten Artikel beschrieben ist. In dem Reaktor werden die Zellen mit Hilfe einer Rührleinrichtung in weitgehend homogener Suspension gehalten. Die Umweltbedingungen, also insbesondere die Temperatur, der Sauerstoffpartialdruck und der pH-Wert werden mit den für Bioreaktoren bekannten Verfahren kontrolliert und im optimalen Bereich konstant gehalten.

Ein wesentlicher Unterschied gegenüber den bekannten Verfahren besteht bei der Erfindung darin, wie die Nährstoffe zu den Zellen zugeführt und die Abfallprodukte von den Zellen abgeführt werden. Dies geschieht mit Hilfe einer semipermeablen Membran, die zwei Räume voneinander trennt. Der einen Seite der Membran wird das Kulturmedium aus dem Innenraum des Reaktors zugeführt. Es enthält neben den Zellen insbesondere die in den bekannten Kulturmedien stets enthaltenen Eiweißsubstanzen, insbesondere das oben erwähnte fötale Kälberserum. Von dem Kulturmedium getrennt ist ein Nährmedium, das lediglich die relativ niedermolekularen Nährstoffe enthält, die von den Zellen laufend verbraucht werden.

Eine semipermeable Membran ist eine Trennwand, durch die manche Moleküle hindurchdiffundieren können, während andere Moleküle zurückgehalten werden. Für die vorliegende Erfindung muß die Durchlässigkeit der Membran so ausgelegt sein, daß sie für die relativ niedermolekularen Nährstoffe der Zellen sowie für deren Abfallprodukte durchlässig, für die höhermolekularen Bestandteile des Kulturmediums aber undurchlässig ist. Die Membran hält infolgedessen die hochmolekularen und besonders wertvollen Bestandteile des Kulturmediums in diesem fest. Sie werden während des Kultivationsvorgangs praktisch nicht verbraucht, so daß sie nicht zugeführt werden müssen. Die niedermolekularen Nährstoffe dagegen können die Membran passieren, so daß auf beiden Membranseiten näherungsweise die gleiche Konzentration an diesen Stoffen vorherrscht. Ähnliches gilt auch für die Abfallprodukte der Zellen, die aus dem Kulturmedium durch die Membran in das Nährmedium gelangen.

Beide Medien werden nun derartig in Bewegung gehalten, daß sie auf der jeweiligen Membranseite fortlaufend vorbeiströmen. Dadurch wird einerseits auf der Nährstoffmedium-Seite der Membran ständig eine ausreichend hohe Nährstoffkonzentration und eine ausreichend niedrige Abfallstoffkonzentration aufrechterhalten. Andererseits ist auch das Kulturmedium insgesamt so weitgehend homogen, daß überall weitgehend optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen herrschen. Im einzelnen muß die Konzentration der Nährstoffe in dem Nährmedium, die Strömungsgeschwindigkeit, mit der das Nährmedium an der Dialysemembran vorbeigeführt wird und die Austauschfläche der Dialysemembran sowie die Strömungsgeschwindigkeit, mit der das Kulturmedium an der Membran vorbeiströmt, so aufeinander abgestimmt sein, daß im stationären Zustand die Konzentration der Nährstoffe in dem Kulturmedium optimiert ist und daß die Konzentration der Abfallstoffe in dem Kulturmedium so gering ist, daß das Wachstum der Zellen nicht wesentlich gestört wird.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß auf diese Weise mit Hilfe einer Dialysemembran nicht nur deren unmittelbare Umgebung in einem Dialysator, sondern der gesamte Innenraum eines Bioreaktors außerordentlich gut mit Nährstoffen versorgt werden kann und daß die Abfallprodukte auf einer so geringen Konzentration gehalten werden können, daß sie das Wachstum kaum stören. Insgesamt ergeben sich damit, wie im folgenden noch näher dargelegt wird, Zeldichten und Produktausbeuten, die den klassischen Suspensionskulturen weit überlegen sind. Dennoch ist das Verfahren einfach und für die Herstellung großer Mengen sehr gut geeignet.

Die semipermeable Membran kann als ebene Fläche, die zwei entsprechende Kammern trennt, ausgebildet sein. Sie kann auch schlauchförmig gestaltet sein oder es kann ein Plattendialysator verwendet werden. Besonders bevorzugt werden Membranhohlfasern verwendet. Dabei strömt bevorzugt das Nährmedium im Innern der Hohlfasern, während das Kulturmedium die Außenseite der Hohlfasern umspült.

Eine erste Ausführungsform der Erfindung, die sich besonders zur Umrüstung bereits vorhandener Bioreaktoren eignet, sieht vor, daß die Membran außerhalb des Bioreaktors angeordnet ist. Die Membran befindet sich in einem Gehäuse, in dem sie zwei Räume trennt. Diese Einheit wird im folgendem als Dialysator bezeichnet. Dabei ist die Nährmedium-Seite der Membran, im Falle eines Hohlfaserdialysators bevorzugt das Innere der Hohlfasern, mit einem Vorratstank für Nährlösung verbunden. Mittels einer Pumpe wird die Nährlösung im Kreislauf durch den Dialysator und zurück in den Vorratsbehälter gepumpt. In einem zweiten Kreislauf wird das Kulturmedium dem Bioreaktor entnommen, ebenfalls durch den Dialysator, nämlich auf der Kulturmedium-Seite der Membran, gepumpt und wieder in den Bioreaktor zurückgeführt.

Dem gegenüber wesentlich bevorzugt ist eine Version, bei der die Membran im Bioreaktor angeordnet ist. Im Falle von Membranhohlfasern läßt sich dies in der Weise realisieren, daß das Hohlfaserbündel, das an beiden Enden mit entsprechenden Anschlußköpfen versehen ist, in dem Bioreaktor frei angeordnet ist. In diesem Fall wird das Kulturmedium durch die in dem Bioreaktor vorhandene Rührleinrichtung an der semipermeablen Membran vorbeigeführt. Bevorzugt ist die Rührleinrichtung so abgestimmt, daß eine Umlösung des Kulturmediums mit einem hohen Austausch des Mediums im Bereich der Membran erreicht wird.

Überraschenderweise ergibt sich bei diesem einfachen Verfahren ein ausreichend guter Austausch zwischen Nährmedium und Kulturmedium. Durch die offene Anordnung der Membran im Innern des Bioreaktors gibt es keine engen Kanäle, in denen es zu einer Verstopfung durch die Zellen oder die Eiweißbestandteile des Mediums kommen könnte.

Statt des Hohlfasdialysators kann auch eine andere Membrangestaltung, wenn auch weniger bevorzugt, in geeigneter Weise im Innern des Bioreaktors angeordnet sein.

Die Erfindung erzielt vor allem folgende Vorteile:

- Die Zeldichte ist annähernd 10 mal so groß wie bei den klassischen Suspensionskulturverfahren in Biorektoren. Sie wird in etwas acht Tagen erreicht und nähert sich asymptotisch einem Maximalwert (Figur 1 c), d.h. es kommt nicht zu einem Abfall der Zeldichte nach Erreichen des Maximums. Infolgedessen ist es nicht notwendig, den Kultivationsvorgang ständig zu überwachen, um den optimalen Zeitpunkt für die Ernte der Zellen festzulegen. Die Konzentrationen der Nährstoffe und der toxischen Abfallprodukte sind nahezu konstant und können sehr gut optimiert werden.
- Die Produktausbeuten sind -insbesondere wegen der hohen Zeldichten -bis zu 30 mal so hoch wie bei den klassischen Verfahren.
- Es wird sehr viel weniger Kulturmedium verbraucht. Infolgedessen wird in hohem Maße insbesondere Serum gespart. Auch dies hängt teilweise mit der hohen Zeldichte zusammen, weil die gleiche Kulturmediummenge bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Produktion einer sehr viel größeren Menge an Zellen und Zellprodukten ausreicht. Hinzu kommt, daß, wie erwähnt, das Serum im Gegensatz zu den geschilderten Perfusionsverfahren während eines Ansatzes nicht erneuert oder ergänzt werden muß. Lediglich die wesentlich kostengünstigeren Nährstoffe werden verbraucht.
- Gegenüber den oben erwähnten neuen Verfahren (Zellzucht auf künstlichen Kapillaren, Einkapselung in Membrankapseln), die teilweise ebenfalls eine recht hohe Zeldichte erreichen, ist die Erfindung vor allem dadurch überlegen, daß in dem Bioreaktor die Umweltbedingungen sehr genau erfaßt und geregelt werden können. So läßt sich beispielsweise der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck ständig messen und entsprechend korrigieren. Wegen der Homogenität der Suspension in dem Bioreaktor sind die Werte überall näherungsweise gleich. Außerdem ist das erfindungsgemäße Verfahren bestechend einfach. Die Investitionsaufwendungen sind verhältnismäßig gering, die Möglichkeiten des Up-scaling sind sehr gut und es müssen keine aufwendigen zusätzlichen Verfahrensschritte, wie beispielsweise beim Einkapseln ergriffen werden.

Die Erfindung und die mit ihr erzielbaren Vorteile werden im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen, die in den Figuren 2 und 3 dargestellt sind, näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 a bis Fig. 1 c die zeitliche Entwicklung der Zeldichte in verschiedenen Suspensionszellkulturen im Bioreaktor etwa im gleichen Maßstab, und zwar Fig. 1 a für einen einfachen Batch-Betrieb, Fig. 1 b für den Betrieb mit kontinuierlicher Zufuhr von Kulturmedium (Chemostat) und Fig. 1 c für das erfindungsgemäße Verfahren.

Fig. 2 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei der sich ein Dialysator mit der Membran außerhalb des Bioreaktors befindet.

- Fig. 3 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei der sich die Membran im Bioreaktor befindet.

Der in Fig. 2 dargestellte Bioreaktor 10 ist mit einem Kulturmedium 12 gefüllt. Dieses Kulturmedium enthält hochmolekulare Eiweißbestandteile, insbesondere Seren wie z.B. fötales Kälberserum. Zur Homogenisierung des Kulturmediums ist eine Rührleinrichtung 14 vorgesehen. Diese besteht im wesentlichen aus einem Motor 16, einer die Reaktorwand durchdringenden Achse 18 und an dieser befestigten Röhrelementen 20. Die Röhrelemente 20 sind bevorzugt schiffsschraubenartig gestaltet (sogenannte Schiffsschraubenimpeller). Eine derartige Form von Röhrelementen, die sich durch abgerundete Begrenzungslinien und eine von außen nach innen kontinuierlich zunehmende Steigung des Anstellwinkels der Rührblätter auszeichnet, hat sich als besonders geeignet erwiesen, um den für die Erfindung notwendigen Grad der Homogenisierung des Kulturmediums zu erreichen, ohne die äußerst empfindlichen Zellen der Kultur zu beschädigen.

Der Innenraum des Bioreaktors 10 ist über Leitungen 22 und 24 mit einem Dialysator 26 verbunden. Die schematische Darstellung zeigt einen Hohlfasdialysator, wie er bevorzugt zur Anwendung kommt. Er ist ähnlich aufgebaut wie dies bei Dialysatoren für die Blutdialyse (sogenannte künstliche Niere) üblich ist. Man erkennt in der Zeichnung an beiden Enden des Dialysators je einen Anschlußkopf 30. Die Hohlfasern 28 verlaufen zwischen den Anschlußköpfen. Die Anschlußköpfe sind so gestaltet, daß die offenen Enden der Hohlfasern mit den Anschlußstutzen 32 und 33 für das Dialysat in hydraulischer Verbindung stehen. Die Innenräume aller Hohlfasern und die Verbindungskanäle bis zu den Anschlußstutzen bilden also einen miteinander verbundenen ersten Raum 34, den man auch als Dialysatraum bezeichnen kann. Dieser ist völlig getrennt von einem auf der Außenseite der Hohlfasern gebildeten zweiten Raum 36, durch den das

Kulturmedium strömt. Er wird im wesentlichen durch die bevorzugt etwa zylinderförmige Wandung 38 des Dialysators 26 und durch die äußeren Oberflächen der Hohlfasern 28 begrenzt. Nähere Angaben, wie ein derartiger Dialysator beispielsweise aufgebaut sein kann, sind der europäischen Patentanmeldung mit der Publikationsnummer 39 055 zu entnehmen, die einen Bltdialysator betrifft.

5 Das Kulturmedium wird mittels einer Pumpe 40 über die Leitung 22 dem beschriebenen zweiten Raum 36 des Dialysators zugeführt, strömt an der dem Kulturmedium zugeordneten Seite der Dialysemembran entlang und fließt über die Leitung 24 in den Bioreaktor 10 zurück.

In einem Nährmediumtank 42 befindet sich Nährmedium 44. Dieses besteht aus einer geeigneten Trägerflüssigkeit und verschiedenen niedermolekularen Bestandteilen, die für die Ernährung der Zellen benötigt werden. Hierzu gehören Glucose, Vitamine, Aminosäuren und Mineralien. Mittels einer Pumpe 46 wird Nährmedium über die Leitung 48 dem Dialysattraum 34 des Dialysators 26 zugeführt. Dort durchströmt es die Hohlfasern 28 und fließt durch die Leitung 50 in den Nährmediumtank 42 zurück.

Das Nährmedium 44 in dem Nährmediumtank 42 wird ausreichend häufig erneuert oder ergänzt, daß die gewünschte Nährstoffkonzentration auf der Nährmediumseite der Dialysemembran aufrechterhalten bleibt. Dies kann entweder dadurch realisiert sein, daß der Nährmediumtank 42 so groß ist, daß die im Laufe eines Kultivationsvorganges sich einstellende Änderung der Nährstoffkonzentration nicht stört oder das Kulturmedium kann während eines Kultivationsvorganges erneuert werden. Auch eine kontinuierliche Zufuhr von Nährstoffen, die die Konzentration in dem Nährmediumtank 42 aufrechterhält, kann vorteilhaft sein.

20 Statt der dargestellten Betriebsweise kann ein Hohlfasdialysator auch so in die beiden Kreisläufe für das Nährmedium einerseits und das Kulturmedium andererseits eingeschaltet sein, daß das Kulturmedium durch das Innere der Hohlfasern fließt, während das Nährmedium deren Außenseite umspült. Diese Lösung ist jedoch weniger bevorzugt, weil die Gefahr einer Verstopfung der Hohlfasern durch die Zellen besteht.

Statt eines Hohlfasdialysators kann auch ein anderer bekannter Dialysatortyp verwendet werden. In 25 jedem Fall ist wesentlich, daß der erste Raum des Dialysators für das Nährmedium und der zweite Raum des Dialysators für das Kulturmedium, die selbstverständlich vollkommen gegeneinander getrennt sein müssen, so daß ein Austausch nur über die Dialysemembran möglich ist, so gestaltet sind, daß die notwendige Austauschfläche sichergestellt ist. Bevorzugt liegt die Austauschfläche für das erfindungsgemäße Verfahren zwischen  $0,01 \text{ m}^2$  je Liter Kulturmedium und  $0,3 \text{ m}^2$  je Liter Kulturmedium, besonders bevorzugt zwischen  $0,03 \text{ m}^2$  und  $0,2 \text{ m}^2$  je Liter Kulturmedium. Außerdem muß der Strömungsverlauf insbesondere in dem vom Kulturmedium durchströmten zweiten Raum 36 so sein, daß die Zellen nirgends zu einer Verstopfung führen können und das Kulturmedium den Raum möglichst glattflächig durchströmen kann.

Die Dialysemembran kann aus einer Vielzahl für derartige Zwecke bekannter Materialien hergestellt sein. 35 Bekannt sind insbesondere Zelluloseacetat, Acrylcopolymere und Polysulfonfasern. Besonders bevorzugt für die Erfindung sind Fasern aus Cupraammonium Rayon. Wesentlich ist, daß die Membran für die niedermolekularen Nährstoffe durchlässig, für die hochmolekularen Eiweißsubstanzen des Kulturmediums aber undurchlässig ist. Praktisch bewährt hat sich eine Membran mit einer Durchlaßgrenze (molecular cut-off) bei einem Molekulargewicht von etwa 10 000, jedoch kann auch eine Membran mit einer Durchlaßgrenze von 100 000 je nach Einsatzfall zweckmäßig sein.

Der Bioreaktor ist mit Einrichtungen zur Überwachung und Konstanthaltung der Umweltbedingungen für die Zellen in dem Kulturmedium 12 versehen. Insbesondere sind Sensoren für den pH-Wert, den Sauerstoffpartialdruck und die Temperatur in dem Bioreaktor 10 vorhanden. Sie sind in der Zeichnung in ihrer Gesamtheit mit 52 bezeichnet. Zu den Einrichtungen zur Überwachung und Konstanthaltung der Umweltbedingungen gehörten weiterhin eine Leitung zur Zufuhr von Gasen 54, durch die insbesondere Sauerstoff zugeführt wird und eine Leitung 56 zur Zufuhr von Säuren und/oder Laugen, mit deren Hilfe der pH-Wert kontrolliert wird. Diese Einrichtungen sind für Suspensionskulturen in Bioreaktoren allgemein bekannt. Die vorliegende Erfindung zeichnet sich jedoch besonders dadurch aus, daß sie nicht nur wie bei den bekannten Bioreaktoren eine sehr genaue Kontrolle der Temperatur, des Sauerstoffpartialdruckes und des pH-Werte ermöglicht, sondern daß gleichzeitig auch die Konzentrationen der Nährstoffe und der Abfallprodukte der Zellen gut kontrolliert und weitgehend konstant in einem Bereich gehalten werden können, der ein optimales Zellwachstum ermöglicht.

Figur 3 zeigt eine besonders bevorzugte Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, die sich gegenüber der in Figur 2 dargestellten Ausführungsform dadurch unterscheidet, daß die semipermeable Membran in dem Bioreaktor angeordnet ist. In dieser Zeichnung sind die entsprechenden Teile jeweils mit der gleichen Nummer wie bei Figur 2 bezeichnet, jedoch mit einem zusätzlichen Strich.

- Bei dieser Ausführungsform der Erfindung werden Membranhohlfasern 28' verwendet, die zwischen den beiden Anschlußköpfen 30' innerhalb des Bioreaktors 10' frei gespannt sind und einen Dialysator 26' bilden, dessen Hohlfaserbündel jedoch nicht von einer Gehäusewandung umgeben ist. Die Anschlußköpfe 30' sind mittels einer geeigneten Halterung 60' an der Wand 62' des Bioreaktors 10' befestigt. Wie bei der
- 5 Ausführungsform nach Figur 2 bilden auch hier die Leitung 48', der Dialysattraum 34' (der durch die Hohlräume in den Anschlußköpfen 30' und die Innenräume der Hohlfasern 28' gebildet wird) und die Leitung 50' einen geschlossenen Kreislauf für das Nährmedium 44'. Ein Austausch zwischen dem Nährmedium 44' und dem Kulturmedium 12' in dem Bioreaktor 10' ist nur über die als Dialysemembran wirkenden Wände der Hohlfasern 28' möglich.
- 10 Bei dieser Ausführungsform wird das Kulturmedium nicht in einem geschlossenen Kreislauf dem für das Kulturmedium vorgesehenen zweiten Raum des Dialysators zugeführt, sondern es wird in dem Bioreaktor so umgewälzt, daß es im Bereich der Umgebung des Dialysators 26' ständig in Bewegung ist und an der Dialysemembran vorbeigeführt wird. Der zweite Raum des Dialysators ist also in diesem Fall kein abgeschlossener Raum, sondern bildet einen nicht abgegrenzten Teil des Innenraums des Bioreaktors 10'.
- 15 Überraschenderweise führt ein derartig einfacher Aufbau zu einem ausgezeichneten Ergebnis. Einerseits ist der Austausch der Nährstoffe und der Abfallstoffe über die Dialysemembran so gut, daß deren Konzentration in dem Bioreaktor weitgehend konstant im optimalen Bereich gehalten werden kann. Andererseits werden die mit einer Ausführungsform nach Figur 2 möglicherweise zu beobachtenden Probleme einer Verstopfung der Leitungen für das Kulturmedium bei dieser Ausführungsform zuverlässig vermieden.

20 Die erfindungsgemäße Vorrichtung wird bevorzugt in folgender Weise betrieben:

Das Kulturmedium wird zusammen mit einer Ausgangskultur der Zellen in den Bioreaktor gefüllt und dieser wird verschlossen. Auch der Nährstofftank wird mit Nährmedium gefüllt und verschlossen. Danach werden die Pumpen und Röhreinrichtungen sowie die Einrichtungen zum Kontrollieren der Umweltbedingungen in Betrieb gesetzt, so daß der Kultivationsvorgang ablaufen kann. Während des Kultivationsvorganges muß die Anlage lediglich überwacht und dafür Sorge getragen werden, daß die Nährstoffkonzentration in der weiter oben beschriebenen Weise aufrechterhalten wird.

Während des Betriebs strömt an der Membran des Dialysators einerseits das Nährmedium, andererseits das Kulturmedium mit kontrollierter Geschwindigkeit vorbei. Die niedermolekularen Bestandteile beider Medien werden über die Dialysemembran ausgetauscht. Die Geschwindigkeit, mit der dabei einerseits Nährstoffe aus dem Nährmedium in das Kulturmedium und andererseits Abfallprodukte der Zellen aus dem Kulturmedium in das Nährmedium übertreten, ist bekanntmaßen von den Konzentrationen der entsprechenden Stoffe auf den beiden Seiten der Membran und der Membranfläche abhängig. Die Stoffkonzentrationen auf beiden Seiten hängen wiederum von den Ausgangskonzentrationen in den Reservoirn, also einerseits in dem Bioreaktor und andererseits in dem Nährmediumvorrat sowie von der Geschwindigkeit ab, mit der die Medien an der Membran vorbeiströmen. Aufgrund dieser bekannten Zusammenhänge ist es jedem Fachmann möglich, die Einzelheiten so einzustellen, daß während der Kultivierung die Nährstoffkonzentration und die Abfallstoffkonzentration in dem Kulturmedium im Bioreaktor im optimalen Bereich liegen. Nach einer Anlaufphase stellt sich bei entsprechender Abstimmung ein stationärer Zustand ein, in dem sowohl die Nährstoffkonzentration als auch die Abfallkonzentration im wesentlichen konstant sind.

40 Da, wie erwähnt, auch die übrigen Umweltbedingungen im optimalen Bereich konstant gehalten werden, wächst die Zellkultur in der in Figur 1 c dargestellten Weise heran, bis die Zeldichte einen Maximalwert erreicht der weit höher ist als bei den bekannten Kultivierungsverfahren. Dieser Wert bleibt im wesentlichen konstant. Wenn er erreicht wird, kann der Bioreaktor geöffnet und die Zellkultur in bekannter Weise geerntet werden.

In Tabelle 1 werden die Ergebnisse, die sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und einer entsprechenden Vorrichtung erzielen lassen, mit den Ergebnissen der Zellkultivierung in einer Bioreaktor-Suspensionskultur, die im Batch-Betrieb ohne Dialysator betrieben wurde, verglichen. Die Ergebnisse sind für vier verschiedene Hybridomazelllinien angegeben. Man erkennt aus der Tabelle, daß je nach Zelltyp eine Verbesserung der maximalen Zeldichte zwischen etwa einem Faktor 6 und einem Faktor 12 erreicht wird. Die maximale Antikörperkonzentration in der Kultur wird noch erheblich stärker verbessert, nämlich um einen Faktor 12 bis zu einem Faktor von mehr als 30.

Zelllinie	Ursprung	maximale Zelldichte		Maximale Antikörperkonzentration	
		bekannte (Batch)	erfundene dungsgem. Bioreaktor-Kultur	bekannte (Batch)	erfundene dungsgem. Bioreaktor-Kultur
[Anzahl pro ml]	[ug pro ml]				
1.	Maus	$10^6$	$6 \times 10^6$	20	300
2.	Mensch	$1.5 \times 10^6$	$2 \times 10^7$	0.3	11
3.	Mensch	$1.5 \times 10^6$	$10^7$	0.5	13
4.	Mensch	$1.5 \times 10^6$	$10^7$	0.8	10

#### Ansprüche

1. Verfahren zum Kultivieren von Zellen, bei dem eine Zellkultur in einem Reaktor unter kontrollierten Umweltbedingungen in einem Kulturmedium mittels einer Röhreinrichtung in weitgehend homogener Suspension gehalten wird, Nährstöße für die Zellen zugeführt und Abfallprodukte der Zellen abgeführt werden, gekennzeichnet durch die Kombination folgender Maßnahmen:
- 30 Es wird ein von dem Kulturmedium getrenntes Nährmedium verwendet, das in einem von dem Kulturmedium durch eine semipermeable Membran getrennten Strömungsweg in einem Kreislauf strömt, wobei die Membran so ausgelegt ist, daß sie für die Nährstoffe und die Abfallprodukte der Zellen durchlässig ist, für die höhermolekularen Bestandteile des Kulturmediums aber undurchlässig ist;
- 35 an der einen Seite der Membran wird das Kulturmedium mit den Zellen vorbeigeführt, an der anderen Seite der Membran wird das die Nährstoffe enthaltende Nährmedium vorbeigeführt, so daß Nährstoffe aus dem Nährmedium durch die Membran in das Kulturmedium gelangen und Abfallstoffe aus dem Kulturmedium in das Nährmedium gelangen.
- 40 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran innerhalb des Reaktors angeordnet ist und das Kulturmedium dadurch an ihr vorbeigeführt wird, daß es in dem Reaktorraum umgewälzt wird.
- 45 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran in Form von Hohlfasern ausgebildet ist, durch deren Innenraum das Nährmedium gepumpt wird.
4. Vorrichtung zum Kultivieren von Zellen mit einem Reaktor (10), der Einrichtungen (52, 54, 56, 57) zum Kontrollieren bestimmter Umweltbedingungen und eine Röhreinrichtung (16, 18) für ein in seinem Innenraum befindliches Kulturmedium (12) aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß
- 50 eine semipermeable Membran vorgesehen ist, die einen ersten Raum (34) und einen zweiten Raum (36) voneinander trennt,
- der erste Raum (34) mit einem Vorrat an Nährmedium (44) über eine Zuführungsleitung (48) und eine Rückführungsleitung (50) verbunden ist, der zweite Raum (36) mit dem Innenraum des Reaktors verbunden ist und
- 55 Einrichtungen zum Zuführen des Nährmediums (44) von dem Vorrat an Nährmedien über die Zuführungsleitung (48) zu dem ersten Raum (34) und zum Rückführen von dem ersten Raum (34) über die Rückführungsleitung (50) zu dem Vorrat und zum Vorbeiführen des Kulturmediums (12) an der dem ersten Raum gegenüberliegenden Seite der Membran vorgesehen sind.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran in Form von Hohlfasern - (28) ausgebildet ist.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran in dem Reaktor (10) angeordnet ist, wobei der erste Raum ein Teil des Innenraumes des Reaktors (10) ist.
- 5 7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 -6, dadurch gekennzeichnet, daß die Austauschfläche des Dialysators mindestens  $0,01 \text{ m}^2/\text{l}$  Kulturmedium und höchstens  $0,3 \text{ m}^2/\text{l}$  Kulturmedium, bevorzugt mindestens  $0,03 \text{ m}^2/\text{l}$  Kulturmedium und höchstens  $0,2 \text{ m}^2/\text{l}$  Kulturmedium, beträgt.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 -7, dadurch gekennzeichnet, daß die Rührreinrichtung mindestens einen Schiffsschraubenimpeller (20) einschließt.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

0 224 800

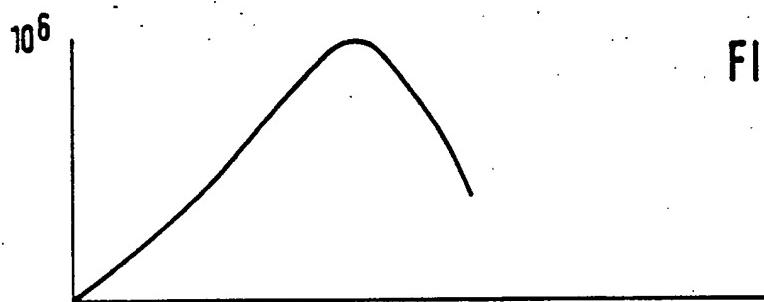


FIG. 1a

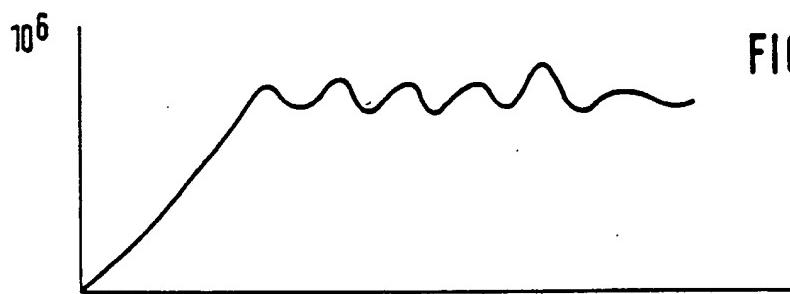


FIG. 1b

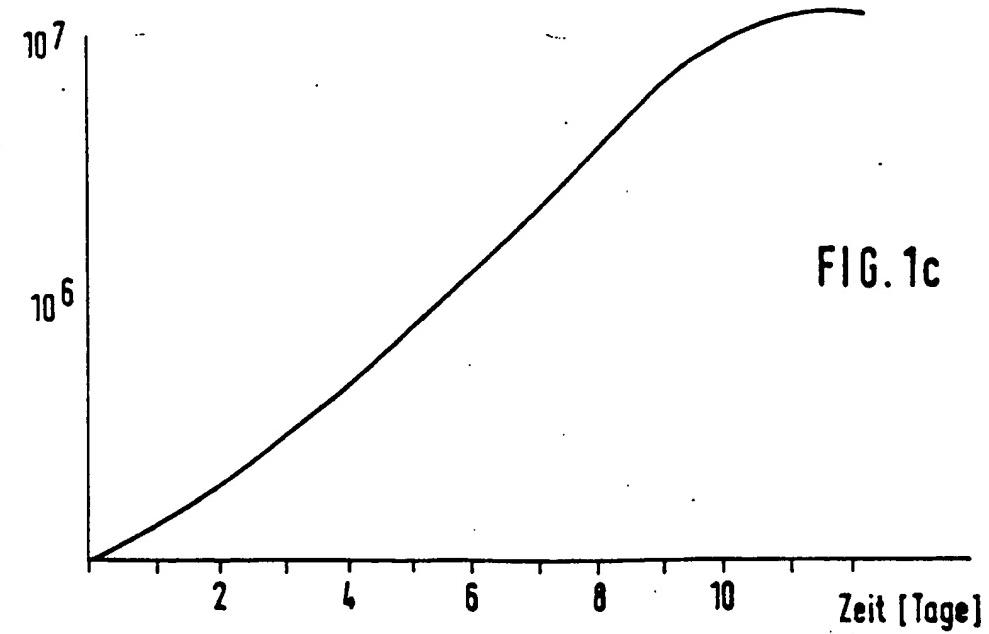


FIG. 1c

FIG. 2

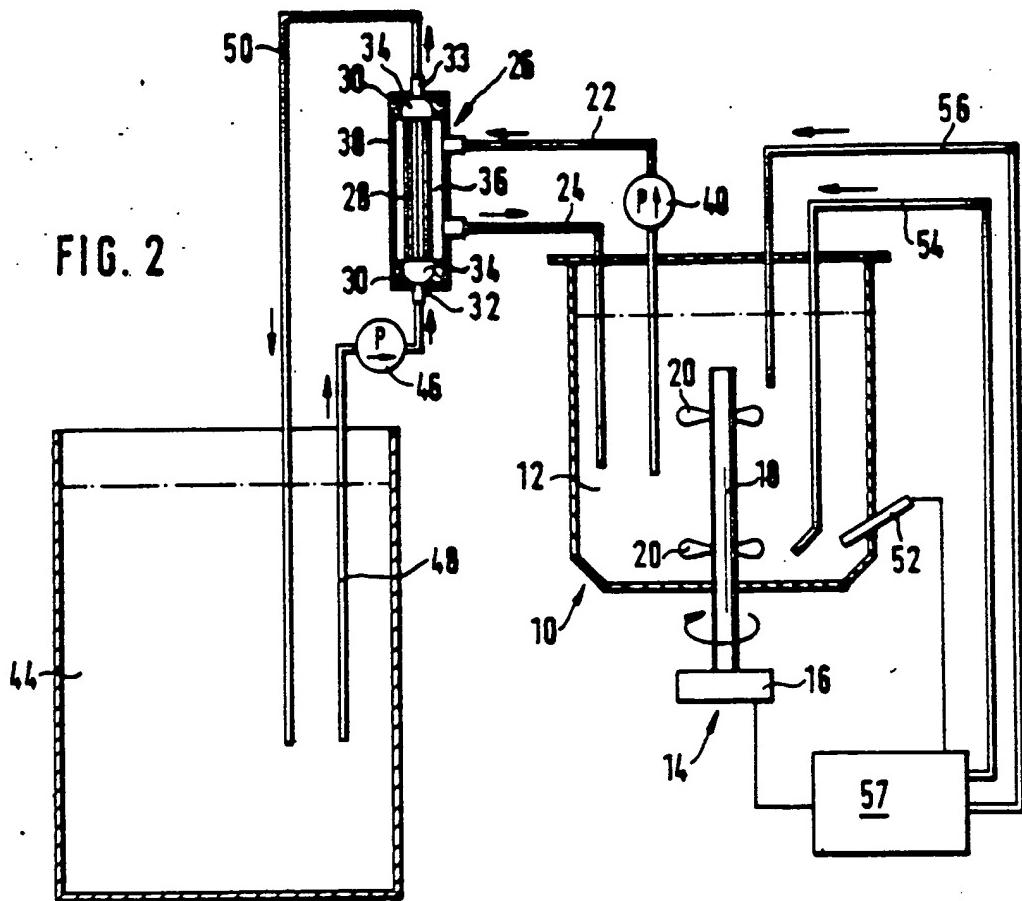


FIG. 3

